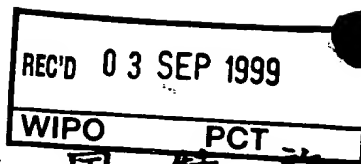


A.D



09/743510

PCT/JP 99/03859

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

16.07.99

5

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 7月17日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第219856号

出願人

Applicant (s):

株式会社中外分子医学研究所
工業技術院長

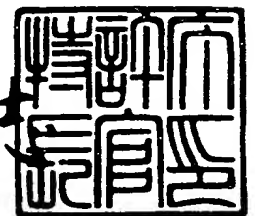
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伊佐山 建志



出証番号 出証特平11-3055055

【書類名】 特許願

【整理番号】 C2-003

【提出日】 平成10年 7月17日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 精巢特異発現性分化制御因子

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

 【氏名】 杉原 崇

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

 【氏名】 レヌー ワダワ

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 通産省工業技術院生命工学工業技術研究所内

 【氏名】 スニル シー カウル

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 通産省工業技術院生命工学工業技術研究所内

 【氏名】 三井 洋司

【特許出願人】

 【識別番号】 596102791

 【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

 【代表者】 大杉 義征

【特許出願人】

 【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【指定代理人】

【識別番号】 220000404

【氏名又は名称】 工業技術院 生命工学工業技術研究所長 大箸 信一

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の指定代理人

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【代理関係の特記事項】 特許出願人 株式会社中外分子医学研究所の代理人

【代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【代理関係の特記事項】 特許出願人 株式会社中外分子医学研究所の代理人

【復代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の復代理人

【復代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の復代理人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

特平 1 0 - 2 1 9 8 5 6

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716403

【書類名】 明細書

【発明の名称】 精巣特異発現性分化制御因子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：4 または 5 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 2】 配列番号：4 または 5 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、および／または付加したアミノ酸配列からなり、請求項 1 に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 3】 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA にハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、請求項 1 に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 6】 請求項 4 に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体。

【請求項 7】 請求項 6 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質を製造する方法。

【請求項 8】 配列番号：1 から 3 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA に特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有する DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、精巣細胞の分化に関与するタンパク質および遺伝子に関し、生物科学分野、詳しくは発生生物の分野に属する。

【0002】

【従来の技術】

発生過程の中で、生殖細胞は体細胞とは異なる減数分裂を含む分化過程を経て精子形成を行う。これら精子形成の分化過程の段階は大きく分けて三つある。第一段階は、精原細胞の増殖と精母細胞への分化、第二段階は精母細胞の減数分裂

、第三段階は精子への変態である。

【0003】

近年、分子生物学の発達により、これらのステージに特異的な遺伝子発現をする遺伝子がいくつか単離された。例えば、精母細胞特異的な遺伝子として、Hox-1.4 (Propst, F. et al. (1988) Oncogene 2:227-33)、HSP70のファミリーである ferT (Sarge, K. D. et al., (1994) Biol Reprod 50:1334-1343)、セリンスレオニンキナーゼである TESK1 (Toshima, J. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:31331-31337) が報告されている。しかしながら、これらの遺伝子産物についての生物的及び物理的な役割については、いまだ知見に乏しい。

【0004】

生殖細胞の分化過程特異的な発現をする遺伝子はそれぞれの生殖細胞の運命を決定づける基本的で重要な役割を担っており、その異常は不妊疾患などの原因となることが予想される。このため生殖細胞の分化過程に特異的な発現を示す遺伝子は、不妊疾患など生殖細胞分化の異常に起因する疾患の予防または治療のための医薬品開発の標的として、近年注目されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、精巣細胞の分化に関係する新規なタンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子を提供することを課題とする。また、本発明は、該タンパク質の製造などに用いられるベクター、形質転換体、および該タンパク質の製造方法を提供することを課題とする。さらに、本発明は、該遺伝子の単離、検出などに用いられるオリゴヌクレオチドを提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、細胞死を引き起こす未知のタンパク質をコードする遺伝子の発現を検討していたところ、偶然にも、初期の目的とは異なる、精巣特異的に発現する新規な遺伝子を単離するに至った。本発明者等は、単離した遺伝子につきデータベース検索を行ったところ、該遺伝子はデータベース上に有意な相同性を示す遺伝子が存在しない新規な遺伝子であった。該遺伝子がコードするタンパ

ク質の構造につき解析を行ったところ、タンパク質はその一部において金属結合因子として知られているメタロチオネインの金属結合部位と同様な構造を保持していた。組織における発現解析においては、該遺伝子は精巣、特に精母細胞において極めて特異的に発現していた。一方、不妊マウスの精巣においては、その発現が認められなかった。また、マウス、ヒト染色体における該遺伝子の存在位置につき解析を行ったところ、不妊マウスとして異常が知られている遺伝子座と同様の場所に存在していた。これらの解析結果から、本発明者らは、単離した遺伝子がコードするタンパク質が精巣の分化制御に関与していることを見出した。

【0007】

本発明は、金属結合部位を有し、精巣分化の制御に関与する新規なタンパク質及びその遺伝子に関し、より具体的には、

- (1) 配列番号：4または5に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、
- (2) 配列番号：4または5に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、および／または付加したアミノ酸配列からなり、(1)に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質、
- (3) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、(1)に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質、
- (4) (1)から(3)のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、
- (5) (4)に記載のDNAを含むベクター、
- (6) (4)に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、
- (7) (6)に記載の形質転換体を培養する行程を含む、(1)から(3)のいずれかに記載のタンパク質を製造する方法、
- (8) 配列番号：1から3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA、に関する

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明は、精原細胞から精母細胞への分化を制御していると考えられるTestinタンパク質およびその遺伝子に関する。

【0009】

本発明者らは、転写過程におけるスプライシングの相違によると考えられる2種類のマウス由来のTestin cDNAを単離した。これらcDNAの塩基配列を配列番号：1および配列番号：2に、これらcDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4に示す。また、本発明者らにより単離されたヒト由来のTestin cDNAの塩基配列を配列番号：3に、該cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：5に示す。

【0010】

配列番号：1および2に示すように、マウス由来のTestin cDNAは、295アミノ酸からなるタンパク質をコードするORFを有する。一方、配列番号：3に示すように、ヒト由来のTestin cDNAは299アミノ酸からなるタンパク質をコードするORFを有する。³⁵Sラベルしたメチオニンを用いたマウスTestinインビトロ翻訳産物のSDS-PAGE解析の結果、マウスのTestinタンパク質は32.5kDaの分子量を示した（図3）。

【0011】

また、ノーザンブロット解析及びRT-PCR法解析により、マウスおよびヒトTestin遺伝子は、それぞれ生体内組織の中で精巣にのみ発現している遺伝子であることが示された（図1、2）。RT-PCR法による解析において、Testin遺伝子は、生後8日目までの未分化の状態ではほとんど発現が見られず、精分化が始まる12日目以降発現が高まり、生後18日目以降安定して高発現となる遺伝子であるということが示された。不妊マウスとして知られている、増殖因子レセプター「c-kit」遺伝子を欠損したW/W^vマウスにおいては、成熟した生後52日目においても、Testin遺伝子の発現がほとんど見られなかった（図4）。これらの事実は、Testinタンパク質が、精巣の分化に関与していることを示唆する。

【0012】

本発明のTestinタンパク質は、該タンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：1から3に記載の塩基配列を有するDNA）を、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体から精製することにより調製することが可能である。さらに、遺伝子組み替え技術を利用した組み替えタンパク

質として、後述するようにTestinタンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。一方、天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば後述のTestinタンパク質に結合する抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィーを行うことにより、精巣組織から単離することが可能である。

【0013】

また、当業者であれば、天然型のTestinのみならず、公知の方法を用いてタンパク質中のアミノ酸の置換などを適宜行い、天然型のタンパク質と同等の機能を有する改変タンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加などにより天然型のタンパク質に対してアミノ酸配列が変異した変異体であって、天然型のタンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた発明のタンパク質に含まれる。「機能的に同等」とは、変異タンパク質が、天然型のタンパク質と同様の生化学的活性および／または生物学的活性を有することを指す。これら活性としては、例えば、タンパク質の金属との結合活性や精巣細胞の分化誘導活性が挙げられる。金属との結合活性の検出は、例えば、まず、リコンビナントTestinタンパク質をEDTA処理し、Testinタンパク質に結合していると考えられる重金属を取り除く。次に、EDTAをゲル濾過で取り除き、測定したい重金属（例えば、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} など）を加え、リコンビナントTestinタンパク質と反応させる。反応後、CD spectropolarimeter (Jasco社製 J-500C) を用いて、金属結合の有無をCD spectraを用いて測定することにより行うことができる (Presta A, et al., Eur.J.Biochem Jan 15; 227(1-2): 226-240参照)。また、精巣細胞分化誘導活性の検出は、例えば、まず、マウスの精巣より遠心分離法により、精祖細胞、精原細胞、精母細胞を単離する。次に、Testin遺伝子を発現ベクター（例えば、pBK-CMVベクター、stratgene社）に組み込み、この組み込みを行った遺伝子をリポフェクタミン (GIBCO BRL社製) により単離した細胞に導入し、数時間から数日間培養の後、分化の時期を同定する遺伝子マーカー（例えば、MEG1やssH2Bなど）の発現をRT-PCR法により確認することにより行うことができる。

【0014】

当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、PCRによる部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland)、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法 (Kramer, W. and Frits, HJ (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367)、Kunkel法 (*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766(1988))などが挙げられる。アミノ酸の変異数は、通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは6アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。

【0015】

また、機能的に同等なタンパク質を単離するための他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook et al., *Molecular Cloning* 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab.press, 1989)が当業者によく用いられている。即ち、当業者であれば、マウス、ヒト由来のTestinタンパク質をコードするDNA (配列番号: 1から3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA) またはその一部を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAからマウス、ヒト由来のTestinタンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることも通常行いうることである。このようにマウス、ヒト由来のTestinタンパク質をコードするDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、これらタンパク質と機能的に同等なタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。ハイブリダイズするDNAを他の生物から単離する場合には、これらに制限されないが、例えば、ラット、ウサギ、ウシなどが用いられた場合、精巢の組織が単離に適している。ハイブリダイズ技術により単離されるDNAは、通常、マウス、ヒト由来のTestinタンパク質をコードするDNA (配列番号: 1から3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA) と高い相同性を有する。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは95%以上の配列の同一性を指す。配列の相同性は、例えば、文献 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:726, 1983) に記載の方法により算出することができる。

【0016】

このような相同性の高いDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件 (ストリンジェントな条件) の例を示せば、以下の如くである。即ち「Rapid-hyb buffer」 (Amersham LIFE SCIENCE社製) を用い、68℃で30分以上プレハイブ

リダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68℃で1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2XSSC、0.01% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1 x SSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、次いで、1 x SSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行う。

【0017】

また、本発明は、上記本発明のTestinタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、上記本発明のTestinタンパク質をコードしうる限り、cDNAの他、ゲノムDNAや合成DNAなども含まれる。本発明のDNAは、例えば、組み替えタンパク質の生産に利用しうる。即ち本発明のDNAは例えば、組み替えタンパク質の生産に利用しうる。即ち、本発明のDNAは、（例えば、配列番号：1、2）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより組み替えタンパク質を調製することが可能である。組み替えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞などの哺乳類細胞、Sf9細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌（E.coli）が挙げられるが、これらに制限されない。また、細胞内で組み替えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしてはpcDNA3（Invitrogen社製）や、pEGF-BOS（Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322）などが、昆虫細胞のベクターとしては「Bac-to-BAC baculovairus expression system」（GIBCO BRL社製）などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」（Invitrogen社製）などが、大腸菌のベクターとしてはpGEX-5X-1（Pharamacia社製）、「QIAexpress system」（Qiagen社製）などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP（ベーリンガーマンハイム社製）を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法などの方法を用いて行うことができる。また、形質転換体の培養は、形質転換体の性質に応じて、当業者の公知の方法で行うことができる。得られた形質転換体からの組み替えタンパク質の精製は、例えば、文献「The Qiaexpressionist hjanbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

【0018】

また、本発明のDNAは、その変異に起因する疾患の遺伝子治療に用いることも考えられる。特に、Testin遺伝子は、遺伝病である不妊マウスの原因遺伝子である可能性が考えられるため、不妊病の遺伝子治療への応用が期待される。遺伝子治療に用いる場合には、本発明のDNAをアデノウイルスベクター（例えば、pAdexLcw）やレトロウイルスベクター（例えば、pZIPneo）などに挿入して、生体内の標的部位へ投与する。投与方法は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

【0019】

また、本発明は、上記本発明のTestinタンパク質をコードするDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAに関する。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、Testinタンパク質以外のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを指す。このようなDNAは、Testinタンパク質をコードするDNAを検出、単離するためのプローブとして、また増幅するためのプライマーとして利用可能である。Testin遺伝子は精巣のみに発現し、また精巣の中でも限定された時期にのみ発現している。このため、これらのDNAは精巣分化のマーカー（検査薬）として利用することが可能である。また、Testin遺伝子は、遺伝病である不妊マウスの原因遺伝子である可能性が考えられるため、これらDNAは、不妊病の検査に利用することも考えられる。

【0020】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0021】

【実施例】

【実施例1】 RT-PCRを用いたTestinの遺伝子断片の単離

新規物質WF-1（1700bpを有する機能未知の新規遺伝子）の各臓器における発現をRT-PCR法によって解析した。具体的には、アイソジェン（日本ジーン社製）を

用いて、ICRストレインマウス（日本クレア社製）の脳、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、精巣からトータルRNAを抽出した。RNAは65℃で変性させた後、リバーストランスクリプターゼ：スパーسكريプト2（GIBCO/BRL社製）を用いcDNAを作成した。それぞれの臓器のcDNAを用い、配列番号：6および7に記載のWF-1増幅用のオリゴプライマーを用い、94℃で1分、58℃で2分、72℃で3分を32サイクルの条件でPCR反応を行った。なお、対照としてのGAPDHの増幅には配列番号：8および9のオリゴプライマーを用い、94℃で1分、58℃で2分、72℃で3分を30サイクルの条件でPCR反応を行った。その結果、偶然にも、配列番号：6および7に記載のWF-1増幅用のオリゴプライマーを用いた検出において、精巣においてのみ特異的に発現する他の遺伝子の存在を見出した。このcDNA断片を単離し、該cDNAがコードする遺伝子を「Testin」と命名した。

【0022】

[実施例2] マウスTestincDNAのクローニングとシーケンス

このcDNA断片の配列をジデオキシチェーントーミネーション法により決定し、ABI377自動配列塩基決定機で分析した。決定した配列につきデータベース検索を行った結果、この配列はデータベース内に相同性を見いだせない新規遺伝子であることが判明した。そこで、このcDNA断片を³²P放射標識してプローブを調製し、これを用いてマウス精巣ライブラリーをスクリーニングを行った。その結果、約1.7kbの長さを有するクローンが得られた。

【0023】

さらに5'末端の配列を決定するために、5'-RACEを行った。5'-RACEにおいては、Testin遺伝子に特異的な3つのアンチセンスプライマー、すなわちSP1（配列番号：10）、SP2（配列番号：11）、SP3（配列番号：12）及びマウス精巣由来5'-Marathon RACE cDNAを用いた。5'-RACE法は「Marathon-Ready™ cDNA kit（マウス精巣）」（Clontech社製）のプロトコールに従って行った。これにより得られたTestin cDNAの全塩基配列を配列番号：1（2241bp）および配列番号：2（1861bp）に示す。これら2つのcDNAは転写時のスプライシングの相違により生じたスプライシングバリエーションであると考えられる。

【0024】

これらのcDNA配列につきデータベース検索を行った結果、データベース内に有意な相同性を有する配列は見いだせなかった。これらcDNAは295アミノ酸からなる同一のタンパク質 (pI-7.64) をコードし、タンパク質データベースにおいても有意に一致するものが見いだせなかった。

【0025】

[実施例3] ヒトTestincDNAのクローニングとシーケンス

マウスTestinプラスミド (pBluescript2ベクターにTestin遺伝子が挿入されたプラスミド) をSphI-SalIで切断した1.7Kbの遺伝子断片をプローブとして、ヒト精巢のmRNAから調製したcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーション条件は「Rapid-hyb buffer」 (Amersham LIFE SCIENCE社製) を用い、60℃で30分プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、60℃で2時間保温することによりハイブリダイゼーションを行った。その後、2XSSC、0.01% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1 × SSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行った。

【0026】

これにより得られたヒトTestincDNAの塩基配列を配列番号: 3に示す。決定された塩基配列につきデータベース検索を行ったが、マウスcDNAと同様にデータベース内に相同性を有するものは見いだせなかった。また、得られたヒトcDNAはマウスTestinより4アミノ酸多い、299アミノ酸からなるタンパク質 (pI-7.71) をコードし、タンパク質データベースにおいても有意に一致するものが見いだせなかった。しかしながら、BLASTによるアミノ酸配列の解析の結果、マウス、ヒトのTestinアミノ酸配列は部分的にはメタロチオネインファミリーの金属結合ドメインと非常に類似な構造を持つシステインリッチなタンパク質であることが判明した。

【0027】

メタロチオネインは肝臓において、重金属で発現が誘導されその金属毒を中和する活性を持つことが知られているタンパク質である。しかし、精巢においてはメタロチオネインは金属で誘導されることなしに、常に遺伝子発現をしている。

そのため、精巣において、メタロチオネインは金属結合をする以外になんらかの重要な役割をしている可能性が考えられてきた。最近の知見として、ジンクフィンガー転写因子でかつ、リセプタータンパク質であるエストロゲンリセプターとメタロチオネインは試験管内において金属の転移を行うことが示された(Cano-Gauci, D. and Sarkar, B. (1996) FEBS Lett 386(1):1-4)。そのため、メタロチオネインの金属結合部位が転写因子の制御に重要な役割をしているのではないかと考えられている。メタロチオネインファミリーの金属結合にはアミノ酸配列におけるシステイン構造を持つ配列「Cys-X-Cys-X-X-X-X-X-X-X-X-Cys-X-Cys (Xは任意のアミノ酸を示す)」が重要な役割を担うとされている。

【0028】

Testinにおいてもこのシステイン構造（マウスにおいては157から171位、ヒトにおいては161から175位）が保存されていた。しかし、これまでに知られているメタロチオネインファミリーは60-70アミノ酸残基からなる比較的低分子であるのに対し、Testinはこれらに比べてアミノ酸の鎖長が長かった（マウスは295アミノ酸残基、ヒトは299アミノ酸残基）。PROSITEによるドメインの検索の結果、マウスTestinにおいてはN-ミリスチル化部位とカゼインキナーゼ2リン酸化部位を有していた。また、ヒトTestinにおいてはcAMPとcGMP依存性キナーゼリン酸化部位、プロテインキナーゼCリン酸化部位、N-ミリスチル化部位、N-グリコシル化部位を有していた。その他に、cAMPやcGMP依存性プロテインキナーゼリン酸化部位やプロテインキナーゼリン酸化部位を有していた。

【0029】

BLOCKSによるドメイン検索において、マウスおよびヒトTestinにおいて共通した部位が見出された。即ち、マウスおよびヒトTestinは、「High potential iron-sulfate protein:」（マウスの87から103位、ヒトの87から103位）、「Adonodoxin family」（iron-sulfate binding region）（マウスの177から194位、ヒトの181から198位）、「Alpha-2-mavroglobulin family thiolester region」（マウスの243から252位、ヒトの247から256位）、Arrestins proteins（マウスの267から277位、ヒトの271から281位）、「Ribosomal protein L14 proteins」（マウスの5から26位、ヒトの5から26位）、「Cooper amine oxidase topaquinone pro

teins」(マウスの81から109位、ヒトの81から109位)、「VFWC domain proteins」(マウスの13から19位、105から113位、ヒトの105から113位)が確認された。また、PRINTSによって配列の特徴を解析したところ、マウス、ヒトTestinともに「Rhodopsin-like GPCR superfamily signature」(マウスの93から117位、231から252位、232から253位、ヒトの43から67位、236から257位)を有していた。

【0030】

[実施例4] 試験管内における転写翻訳

予想されるマウスTestinのオープンリーディングフレームを確認するためにインビトロトランスレーションを行った。具体的には、精巢からクローニングしたcDNA pBluescript-Testinを、L-[³⁵S]メチオニンを添加したウサギ網状赤血球溶解物(Promega社製)を用いて試験管内で1時間、転写、翻訳を行った。翻訳産物をSDS-PAGE法で分離し、オートラジオグラフィーで検出した。その結果、ほぼ32.5kDaの大きさのタンパク質が検出された(図3)。この転写産物はマウスTestin配列内のORFとして考えられるタンパク質の大きさとよく一致していた。

【0031】

[実施例5] 組み替えTestinの調製

マウスTestin cDNAのオープンリーディングフレームを、EcoRI部位を持つセンス(配列番号:19)及びアンチセンス(配列番号:20)プライマーを用い、PCR反応によって増幅した。PCR反応で増幅したフラグメントをpGEM-Tベクターにクローン化し、その正確な配列を確認した。次いで、EcoRI-EcoRIを用いて切断し、最終的にGST融合タンパク質を産生するpGEX-2TKベクターにクローン化した。このpGEX2-TK内にクローン化したTestin産生物を大腸菌JM109に遺伝子導入し、IPTG 0.2mMを用いて37℃で3時間誘導し、この大腸菌の溶解物をSDS-PAGE法で分離し、GST抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。その結果、GST融合部分の分子量26kDaを含んだ、58.5kDaのタンパク質が合成された(図8左)。組み替えタンパク質の大きさは、インビトロトランスレーションの結果と同様に分子の推定の大きさから予想されたものと同じであった。

【0032】

[実施例6] ノーザンブロット解析

マウス、ヒトの様々な組織のmRNAをレーンあたり2 μ gのせたメンブレン (Clontech laboratories, Palo alto, CA) を購入し、ノーザンブロット解析を行った。プローブはマウスTestinプラスミド (pBluescript2ベクターにTestin遺伝子が挿入されたプラスミド) をSphI-SalIで切断した1.7Kbの遺伝子断片をプローブとして用いた。ハイブリダイゼーション条件は「Rapid-hyb buffer」 (Amersham LIFE SCIENCE社製) を用い、68℃で30分プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68℃で2時間保温することによりハイブリダイゼーションを行った。その後、2XSSC、0.01% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1 x SSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、次いで、1 x SSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行った。検出はオートラジオグラフィーによって行った。Testin遺伝子の発現はRT-PCR法による結果と同様に、精巣においてのみ検出され、マウスでは2.4Kbと2.0Kbの位置に (図1)、ヒトでは2.4Kbの位置にのみ遺伝子発現を確認した (図2)。

【0033】

[実施例7] 生殖細胞分化への関与

アイソジェン (日本ジーン社製) を用いて、ICRストレインマウスの生後4日、8日、12日、18日、42日目の精巣から、また56日目のW/W^vストレインマウス (日本SLC社製 種類WBB6F1-W/W^v/このマウスは増殖因子Slファクターのレセプターc-kit遺伝子を欠損したマウスで不妊マウスとして知られている。Chabot, B. et al. (1988) Nature 335(6185):88-9、Yoshinaga, K. et al. (1991) Development 113(2):689-99参照) の精巣からトータルRNAを抽出し、RNAを65℃で変性させた後、リバーストランスクリプターゼ：スパースクリプト2 (GIBCO/BRL社製) を用いcDNAを作成した。Testinの反応は、配列番号：6および7に記載のオリゴプライマーを用い、94℃で1分、58℃で2分、72℃で3分を35サイクルの条件で行った。また対照としてのGAPDHの反応は配列番号：7および8に記載のオリゴプライマーを用い、94℃で1分、58℃で2分、72℃で3分を30サイクルの条件で、MEG1の反応には配列番号：13および14のオリゴプライマーを用い、94℃で1分、58℃で2分、72℃で3分を35サイクルの条件で、ssH2Bの反応は配列番号：15および16のオリゴプライマーを用い、94℃で1分、58℃で2分、72℃で3分を35サイクルの条件でPCR反応を行

った。なお、マーカーとして用いたMEG1は精原細胞から精母細胞への分裂時期に発現し (Don, J. and Wolgemuth, D.J. (1992) Aug;3(8):495-505)、また、ssH2Bは精子形成時に発現するとするとして知られている (Unni, E. et al. (1995) Biol Reprod, Oct;53(4):820-826)。

【0034】

PCR解析の結果、Testin遺伝子は生後8日目までは発現せず、その後12日目でやや弱く、18日目以降安定的な発現パターンを見せた (図4)。Testin遺伝子の精巣における発現はMEG1と同様の発現パターンを示した。このためTestinが、MEGと同時期に発現制御されていることが判明した。

【0035】

また、W/WvマウスにおいてTestinの発現を調べたところ、W/WvマウスにおいてはTestin遺伝子が発現していないことが判明した。W/Wvマウスは不妊マウスとして知られており、Testin遺伝子と不妊との関係が強く示された (図4)。

【0036】

[実施例8] インシチュウ・ハイブリダイゼーション

マウスTestinプラスミド (pBluescript2ベクターにTestin遺伝子が挿入されたプラスミド) からT7、T3ポリメラーゼとジゴキシゲニン-d UTPを用いて標識したRNAプローブを作成した。このプローブを50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、2 x SSC を含む溶液中でスライスしたマウスの精巣組織とハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたスライドガラスをアルカリホスファターゼを結合した抗ジゴキシゲニン抗体中でインキュベートし発色基質NBT/BCIPを用いてハイブリダイゼーションに特異的なシグナルを検出した。その結果、Testinは、精巣においても特に、精母細胞の時期において非常に特異的に発現していることが確認された (図5)。

【0037】

[実施例9] 染色体上の配置

マウスTestinに特異的なセンスプライマー (配列番号: 6) 及びアンチセンスプライマー (配列番号: 7) を用いたP1バクテリオファージゲノムライブラリーのPCRスクリーニングにより、マウスのP1ゲノムライブラリーを得た。また、ヒ

トTestinに特異的なセンスプライマー（配列番号：17）及びアンチセンスプライマー（配列番号：18）を用い、マウスと同様のスクリーニング法により、ヒトのP1ゲノムライブラリーを得た。単離したP1クローンは蛍光インシチュアハイブリダイゼーション（FISH）により染色体における局在性を調べるために使用した。マウス、ヒトのP1クローン由来のDNAをニックトランスレーションによりジゴキシゲニン-d UTPを用いて標識し、そのプローブを、50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、2 x SSC を含む溶液中でマウス、ヒトの初期繊維芽細胞由来の分裂中期染色体とハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたスライドガラスを蛍光標識した抗ジゴキシゲニン抗体中でインキュベートし、さらに4'6' ジアミノ-2- フェノールインドール（DAPI）を用いたカウンター染色によりハイブリダイゼーションに特異的なシグナルを検出した。

【0038】

その結果、マウス、ヒトTestinに特異的なプローブはクローニングされたそれぞれのP1クローンにハイブリダイズしたため、これらのP1クローンはTestin遺伝子をコードしていることが判明した。また、これらのP1クローンをプローブとしてDAPI染色を行った結果、マウスでは19番B染色体がヒトでは11番染色体のq13.2領域が、特異的に標識された。以上のことから、Testinはマウス19番B染色体上（図6）に、ヒトでは11番q13.2染色体上（図7）に存在することが確認された。また、この結果をもとにTestinとマウスの遺伝病との関わりをジャクソンラボラトリーのデータベースを用いて調べたところ、Testinの存在する19番Bの位置の変異がマウスの不妊を引き起こすという研究が報告されている（Evans, EP. (1977) Mouse News Letter, 17）。この事実は、Testinの変異がマウスの不妊症を引き起こしている可能性を示している。

【0039】

[実施例10] 細胞内での局在

EcoRI部位を持つセンス（配列番号：19）及びアンチセンス（配列番号：20）プライマーを用いTestin cDNAの全てのオープンリーディングフレームを、また、EcoRI部位を持つセンス（配列番号：19）及びSalI部位を持つアンチセンス（配列番号：21）プライマーを用いTestin cDNAのオープンリーディングフレーム

から70アミノ酸をディレーションするように設計された遺伝子を作製した。これらの遺伝子を制限酵素処理後、pEGFC1ベクター（Clontech社製）におけるGFP ORFのC末端領域に挿入した。GFP-Testin融合タンパク質をコードするこのプラスミドをカバーガラス上で生育しているCOS1細胞にTfx-50（Promega社製）を用いて導入した。カバーガラスメタノール/アセトン（1:1）で固定し、PBSで3回洗浄した。細胞はエピフルオレッセンス光学系のオリンパスBH-2顕微鏡で観察した。その結果、Testin全配列を融合させたタンパク質は細胞質内に局在していたが、Testinの一部の配列を欠損させたものは核内に移行していることが明らかとなった（図8）。

【0040】

【発明の効果】

本発明により、金属結合部位を有し、精巣細胞の分化に密接に関与するTestinタンパク質およびその遺伝子が提供された。Testinタンパク質およびその遺伝子は、精子形成の分化に関与し、さらには不妊マウスにおいて遺伝子発現がなく、また遺伝病である不妊マウスの原因遺伝子である可能性が考えられる。そのため、例えば、Testin遺伝子を体内もしくは細胞に導入することによって、不妊病の遺伝子治療への応用が期待される。また、Testinは精巣のみに発現し、また精巣の中でも限定された時期にのみ発現している遺伝子であるため、精巣細胞の分化時期を決定するための検査薬としての応用も考えられる。さらには、Testinはメタロチオネインと同様の金属結合部位を持つと考えられるため、メタロチオネインと同様の金属毒解毒薬としての応用も考えられる。また、精巣における金属との結合の意義を解析するような応用研究への利用も期待される。

【 0 0 4 1 】

【配列表】

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

<120> Testis specific factor

<130> C2-003

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (651)..(1535)

<400> 1

tatcctgtgg gttggccccg ggcagcaggc tctcagcagg ctcaggcacc acaagggata 60

cacagtgtgt gttcctggcc tgttggactt gtgactccac ccacctccgc cccagcaggg 120

ctagggatag aacccagggc cttttgcgtg ttctgcagat agtcttcagc ctggtagttt 180

ggggttggct gggagatttt tttttcttca caccaaagac ttccattatt gaggattttt 240

tcagttgatg atctcccccc tctgtaagat aaggacagc tctttaaacc tatgtagagt 300

tttgatgaat tctgcttctc aaccatattg ctaagctata tagcaattcc ttgaaattgc 360

tatataactt aggagaacct ctgattctcc tgcctctaca tcctgagtgc taggtgtaca 420

gggggaaatc attttgggtga gactccgatg aactactgcc aggttcccaa ggcagcaagc 480

aagcaagaaa aagtgttgaa atcaaagaag caggtggtag tgtgccaggc ggcagccctg 540

aagacgcagc ttccaggcc cctctggctc aggaatcctg ttgcaagtc ccatcatccc 600

aggaggcaga ggaggcctcc agctgccctc ggaagaaaga ctccagcccc atg gtg 656

Met Val

1

att tgt cag ctg aaa gga ggc gcc cag atg ctc tgc ata gac aac tgt 704

Ile Cys Gln Leu Lys Gly Gly Ala Gln Met Leu Cys Ile Asp Asn Cys

5

10

15

ggc gcg agg gag ctc aaa gcg ctc cat ctg ctt cct cag tac gat gac 752

Gly Ala Arg Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Leu Pro Gln Tyr Asp Asp

20

25

30

cag agc agt ttc cct cag tca gag ctc cct aag cca atg aca act tta 800

Gln Ser Ser Phe Pro Gln Ser Glu Leu Pro Lys Pro Met Thr Thr Leu
35 40 45 50

gtg gga aga ctt ctg cca gta cca gcg aag tta aat ctc atc aca cag 848
Val Gly Arg Leu Leu Pro Val Pro Ala Lys Leu Asn Leu Ile Thr Gln
55 60 65

gtt gat aat gga gct ctc cca tca gct gtc aat ggg gct gcc ttt ccc 896
Val Asp Asn Gly Ala Leu Pro Ser Ala Val Asn Gly Ala Ala Phe Pro
70 75 80

tct gga cct gct ctg caa ggg cca ccc aaa ata act ctg tct ggg tac 944
Ser Gly Pro Ala Leu Gln Gly Pro Pro Lys Ile Thr Leu Ser Gly Tyr
85 90 95

tgt gac tgc ttc tcc agc ggg gac ttc tgc aac agc tgc agc tgc aac 992
Cys Asp Cys Phe Ser Ser Gly Asp Phe Cys Asn Ser Cys Ser Cys Asn
100 105 110

aac ctg cgc cat gag ctc gag cgc ttc aaa gcc ata aag gcg tgt ctt 1040
Asn Leu Arg His Glu Leu Glu Arg Phe Lys Ala Ile Lys Ala Cys Leu
115 120 125 130

gat aga aat cct gaa gct ttc caa cca aaa atg ggg aaa ggc cgt ctg 1088
Asp Arg Asn Pro Glu Ala Phe Gln Pro Lys Met Gly Lys Gly Arg Leu
135 140 145

gga gct gct aaa ctt cga cac agc aaa ggg tgc aac tgt aag cgc tca 1136
Gly Ala Ala Lys Leu Arg His Ser Lys Gly Cys Asn Cys Lys Arg Ser

150	155	160	
ggc tgc ctg aag aac tac tgt gag tgc tat gag gcc aaa atc atg tgt			1184
Gly Cys Leu Lys Asn Tyr Cys Glu Cys Tyr Glu Ala Lys Ile Met Cys			
165	170	175	
tct tcc att tgc aaa tgc att gct tgc aaa aac tat gaa gaa agt cca			1232
Ser Ser Ile Cys Lys Cys Ile Ala Cys Lys Asn Tyr Glu Glu Ser Pro			
180	185	190	
gaa cga aaa atg ctg atg agc aca ccc cac tac atg gag cct ggg gac			1280
Glu Arg Lys Met Leu Met Ser Thr Pro His Tyr Met Glu Pro Gly Asp			
195	200	205	210
ttt gag agc agc cat tat ttg tcc cca gcc aag ttc tca gga cct cca			1328
Phe Glu Ser Ser His Tyr Leu Ser Pro Ala Lys Phe Ser Gly Pro Pro			
215	220	225	
aaa ctg aga aaa aat agg cag gcc ttc tcc tgt atc tcc tgg gaa gta			1376
Lys Leu Arg Lys Asn Arg Gln Ala Phe Ser Cys Ile Ser Trp Glu Val			
230	235	240	
gtg gag gcc aca tgt gcc tgc ctg ctg gcc cag ggt gag gaa gca gag			1424
Val Glu Ala Thr Cys Ala Cys Leu Leu Ala Gln Gly Glu Glu Ala Glu			
245	250	255	
cag gag cac tgt tcc cca agc ttg gct gag cag atg atc ctg gag gag			1472
Gln Glu His Cys Ser Pro Ser Leu Ala Glu Gln Met Ile Leu Glu Glu			
260	265	270	

ttt gga agg tgc ctg tgc cag att ctc cac atc gag ttc aag tcc aag 1520

Phe Gly Arg Cys Leu Ser Gln Ile Leu His Ile Glu Phe Lys Ser Lys

275

280

285

290

ggg ctg aaa att gag tagcgtgcaa gctggtaaag gggaatgcct gtggcaagcc 1575

Gly Leu Lys Ile Glu

295

tcagccctgg gaatctgcac cgaggaagct ggtgcccagg gaggagcaga ggccgcgcat 1635

catggccagg tcagctgtga ggtctgagtg atctgcatgg tactggccag cctactcaag 1695

gtatcctaaa gtgcaagcag gcagagccac cctggggatg gacactggcc ctcctgtccc 1755

tggggaggcc ctctggggac tccctgccct gcataaaaag aggggtgattt tctacttggt 1815

gttatgtgtt tgctttcaaa ttgcttagta gtacctccat tcaagttatt atgagccagc 1875

ctcaagttag agagctaggc tcttcttcag gtggactctg cccaaatcac atacaagtca 1935

ggtggccatc aggggttttt ccaggccagg cctgtgacag gagatatggg aggggggtcg 1995

ggttagagct gggtttggtt ggattttttg cgtttttttc ttctgtatt tctgcttgaa 2055

gtgagaaaac ttgtctcctg tccaaccttt tctccataat tactgctgca cggtcgcctg 2115

ctgaccagtc acagtgacct cagacaccag aaggtagaggt ggcttattat gcccacactt 2175

tgtgttttgt tgtgagaata aacctttcca gactcccaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2235

aaaaaa 2241

<210> 2

<211> 1861

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (271)..(1155)

<400> 2

ccagacgacg ccgctccgcc tcccgctac agcgtgcacg tggtatcgtc gttacttccc 60

ggtgctcgcg ggcccgcgt gttgccgcta agcgcaggag tgcgcgtgat ccagttgaa 120

atcaaagaag caggtggtag tgtgccaggc ggcagccctg aagacgcagc ttccaggcc 180

cctctggctc aggaatcctg ttgcaagttc ccatcatccc aggaggcaga ggaggcctcc 240

agctgccctc ggaagaaaga ctccagcccc atg gtg att tgt cag ctg aaa gga 294

Met Val Ile Cys Gln Leu Lys Gly

1

5

ggc gcc cag atg ctc tgc ata gac aac tgt ggc gcg agg gag ctc aaa 342

Gly Ala Gln Met Leu Cys Ile Asp Asn Cys Gly Ala Arg Glu Leu Lys

10

15

20

gcg ctc cat ctg ctt cct cag tac gat gac cag agc agt ttc cct cag 390
 Ala Leu His Leu Leu Pro Gln Tyr Asp Asp Gln Ser Ser Phe Pro Gln
 25 30 35 40

tca gag ctc cct aag cca atg aca act tta gtg gga aga ctt ctg cca 438
 Ser Glu Leu Pro Lys Pro Met Thr Thr Leu Val Gly Arg Leu Leu Pro
 45 50 55

gta cca gcg aag tta aat ctc atc aca cag gtt gat aat gga gct ctc 486
 Val Pro Ala Lys Leu Asn Leu Ile Thr Gln Val Asp Asn Gly Ala Leu
 60 65 70

cca tca gct gtc aat ggg gct gcc ttt ccc tct gga cct gct ctg caa 534
 Pro Ser Ala Val Asn Gly Ala Ala Phe Pro Ser Gly Pro Ala Leu Gln
 75 80 85

ggg cca ccc aaa ata act ctg tct ggg tac tgt gac tgc ttc tcc agc 582
 Gly Pro Pro Lys Ile Thr Leu Ser Gly Tyr Cys Asp Cys Phe Ser Ser
 90 95 100

ggg gac ttc tgc aac agc tgc agc tgc aac aac ctg cgc cat gag ctc 630
 Gly Asp Phe Cys Asn Ser Cys Ser Cys Asn Asn Leu Arg His Glu Leu
 105 110 115 120

gag cgc ttc aaa gcc ata aag gcg tgt ctt gat aga aat cct gaa gct 678
 Glu Arg Phe Lys Ala Ile Lys Ala Cys Leu Asp Arg Asn Pro Glu Ala
 125 130 135

ttc caa cca aaa atg ggg aaa ggc cgt ctg gga gct gct aaa ctt cga 726

Phe Gln Pro Lys Met Gly Lys Gly Arg Leu Gly Ala Ala Lys Leu Arg

140

145

150

cac agc aaa ggg tgc aac tgt aag cgc tca ggc tgc ctg aag aac tac 774

His Ser Lys Gly Cys Asn Cys Lys Arg Ser Gly Cys Leu Lys Asn Tyr

155

160

165

tgt gag tgc tat gag gcc aaa atc atg tgt tct tcc att tgc aaa tgc 822

Cys Glu Cys Tyr Glu Ala Lys Ile Met Cys Ser Ser Ile Cys Lys Cys

170

175

180

att gct tgc aaa aac tat gaa gaa agt cca gaa cga aaa atg ctg atg 870

Ile Ala Cys Lys Asn Tyr Glu Glu Ser Pro Glu Arg Lys Met Leu Met

185

190

195

200

agc aca ccc cac tac atg gag cct ggg gac ttt gag agc agc cat tat 918

Ser Thr Pro His Tyr Met Glu Pro Gly Asp Phe Glu Ser Ser His Tyr

205

210

215

ttg tcc cca gcc aag ttc tca gga cct cca aaa ctg aga aaa aat agg 966

Leu Ser Pro Ala Lys Phe Ser Gly Pro Pro Lys Leu Arg Lys Asn Arg

220

225

230

cag gcc ttc tcc tgt atc tcc tgg gaa gta gtg gag gcc aca tgt gcc 1014

Gln Ala Phe Ser Cys Ile Ser Trp Glu Val Val Glu Ala Thr Cys Ala

235

240

245

tgc ctg ctg gcc cag ggt gag gaa gca gag cag gag cac tgt tcc cca 1062

Cys Leu Leu Ala Gln Gly Glu Glu Ala Glu Gln Glu His Cys Ser Pro

250

255

260

agc ttg gct gag cag atg atc ctg gag gag ttt gga agg tgc ctg tcg 1110

Ser Leu Ala Glu Gln Met Ile Leu Glu Glu Phe Gly Arg Cys Leu Ser

265

270

275

280

cag att ctc cac atc gag ttc aag tcc aag ggg ctg aaa att gag 1155

Gln Ile Leu His Ile Glu Phe Lys Ser Lys Gly Leu Lys Ile Glu

285

290

295

tagcgtgcaa gctggtaaag gggaatgcct gtggcaagcc tcagccctgg gaatctgcac 1215

cgaggaagct ggtgcccagg gaggagcaga ggccgcgcac catggccagg tcagctgtga 1275

ggtctgagtg atctgcatgg tactggccag cctactcaag gtatcctaaa gtgcaagcag 1335

gcagagccac cctggggatg gacactggcc ctctgtccc tggggaggcc ctctggggac 1395

tccctgccct gcataaaaag aggggtgattt tctacttggtt gttatgtgtt tgctttcaaa 1455

ttgcttagta gtacctccat tcaagttatt atgagccagc ctcaagttag agagctaggc 1515

tcttcttcag gtggactctg cccaaatcac atacaagtca ggtggccatc aggggttttt 1575

ccaggccagg cctgtgacag gagataiggg aggggggtcg ggtagagct gggtttgttt 1635

ggattttttg cgtttttttc ttcctgtatt tctgcttgaa gtgagaaaac ttgtctcctg 1695

tccaaccttt tctccataat tactgctgca cggtcgcctg ctgaccagtc acagtgacct 1755

cagacaccag aaggtaggtt ggcttattat gccacacctt tgtgttttgt tgtgagaata 1815

aacctttcca gactcccaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1861

<210> 3

<211> 2134

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (407)..(1303)

<400> 3

aattcggggt caaggcgaag ctgcgggggg gcgacagcga cggcggggag ctccctcgggg 60

agtaccccggt gatccagag ctacgcgcgc tggaggacgt cgcgctcctg caggccccgc 120

agccgccccgc ctgcaacgtg cacttcctgt cctcgtctgt acccgcgcac cgcagccccgc 180

gggtgttttg cccctggggc gcctgggtcc tgcgaaggag cctcccaccc gggcgtccgc 240

atgatcccag ttgaaatcaa ggtaagcagg tggctactact acaagtaata atccggaaga 300

agcaactttg cagaatcttc ttgctcagga atcctgttgc aagttcccat ggtcccagga 360

actagaggat gcctcctgct gtctctcttaa gaaagattcc aaccca atg gtg ata 415

Met Val Ile

1

tgc caa ttg aaa ggg ggc aca caa atg cta tgt ata gac aat tct aga 463

Cys Gln Leu Lys Gly Gly Thr Gln Met Leu Cys Ile Asp Asn Ser Arg

5

10

15

aca aga gaa cta aaa gca ctc cat ttg gtt cct cag tat caa gat caa 511

Thr Arg Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Val Pro Gln Tyr Gln Asp Gln

20

25

30

35

aat aat tat cta cag tca gat gtc cct aaa cca atg act gct tta gta 559

Asn Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Val Pro Lys Pro Met Thr Ala Leu Val

40

45

50

ggg aga ttt ttg cca gca tca aca aaa tta aat ctc att aca caa caa 607

Gly Arg Phe Leu Pro Ala Ser Thr Lys Leu Asn Leu Ile Thr Gln Gln

55

60

65

ctt gag gga gcc tta cca tcg gta gtc aac ggg tct gct ttc ccc tcg 655

Leu Glu Gly Ala Leu Pro Ser Val Val Asn Gly Ser Ala Phe Pro Ser

70

75

80

gga tca act ctt cca gga cca cca aaa ata act ttg gct ggg tac tgt 703

Gly Ser Thr Leu Pro Gly Pro Pro Lys Ile Thr Leu Ala Gly Tyr Cys

85

90

95

gac tgc ttt gcc agt ggg gac ttt tgc aac aac tgc aat tgt aat aat 751

Asp Cys Phe Ala Ser Gly Asp Phe Cys Asn Asn Cys Asn Cys Asn Asn

100	105	110	115	
tgt tgc aac aac ttg cat cat gat att gaa cgg ttt aaa gcc att aag				799
Cys Cys Asn Asn Leu His His Asp Ile Glu Arg Phe Lys Ala Ile Lys				
	120	125	130	
gca tgt ctt ggt aga aat cca gaa gct ttc cag cca aaa att ggg aag				847
Ala Cys Leu Gly Arg Asn Pro Glu Ala Phe Gln Pro Lys Ile Gly Lys				
	135	140	145	
ggc caa ttg ggc aat gtc aag ccc cag cac aac aaa ggg tgc aac tgc				895
Gly Gln Leu Gly Asn Val Lys Pro Gln His Asn Lys Gly Cys Asn Cys				
	150	155	160	
agg agg tca ggc tgc ctg aag aat tac tgc gag tgc tat gag gcc caa				943
Arg Arg Ser Gly Cys Leu Lys Asn Tyr Cys Glu Cys Tyr Glu Ala Gln				
	165	170	175	
att atg tgt tct tct att tgc aaa tgc att ggt tgc aaa aat tat gaa				991
Ile Met Cys Ser Ser Ile Cys Lys Cys Ile Gly Cys Lys Asn Tyr Glu				
180	185	190	195	
gaa agc cca gaa cga aag aca cta atg agc atg cca aac tac atg cag				1039
Glu Ser Pro Glu Arg Lys Thr Leu Met Ser Met Pro Asn Tyr Met Gln				
	200	205	210	
act gga ggt ttg gaa ggc agc cat tac ctg cca cca acg aaa ttt tca				1087
Thr Gly Gly Leu Glu Gly Ser His Tyr Leu Pro Pro Thr Lys Phe Ser				
	215	220	225	

gga ctt cca aga ttc agt cac gat agg cgg cct tcc tca tgc atc tcc 1135

Gly Leu Pro Arg Phe Ser His Asp Arg Arg Pro Ser Ser Cys Ile Ser

230

235

240

tgg gag gtg gtg gag gcc aca tgc gcc tgc ctg ctt gct cag gga gaa 1183

Trp Glu Val Val Glu Ala Thr Cys Ala Cys Leu Leu Ala Gln Gly Glu

245

250

255

gag gcc gag aaa gaa cac tgc tcc aag tgc ctg gca gag cag atg atc 1231

Glu Ala Glu Lys Glu His Cys Ser Lys Cys Leu Ala Glu Gln Met Ile

260

265

270

275

ctg gag gaa ttt gga agg tgc tta tca cag att ctc cac act gag ttt 1279

Leu Glu Glu Phe Gly Arg Cys Leu Ser Gln Ile Leu His Thr Glu Phe

280

285

290

aaa tct aag gga ttg aaa atg gag tagagtataa agtgtgaatg catgttgatt 1333

Lys Ser Lys Gly Leu Lys Met Glu

295

ttgtcttagt ctagaaatct ctagttaga aaggatgttt aggggaacat gaggctggct 1393

ctgcagcaac aaccaggctc cccatgcatcc ctgggccag ggagtttact cagagctctc 1453

tgaagatgtg gcaacccatg ccccttttc tgaggaggtg catggcctga gcattgtttg 1513

tctggcccag aggagagagc ttgggttccc atagtcctgg gagagtgtct gcagggcggc 1573

ggagggcaga gcaggccctg cggagagctc actctggctg actcttcctc tcagagaatg 1633

ttgctctgga ggctgctctg catgaaaacc ctaatggttt cttgtttgtt tttcaaatta 1693

tttagaaata agttctccgg atgggctgtt gtgataccac ttaaaatctc tagagaacta 1753

ctgaacacct aaagattttc tgtagcgtag atatttcccc agagacacgc gaactgtcag 1813

tctttcctaa ggcccccgga agacgcaggc aatggggcct cgcaggccag gcttgcacca 1873

gcatgtcttg agttagagga cttaaaatta tccagtttct tctgtgttcc tacttgaatt 1933

gtggaaaagc tctattatcc aattaacttc tccataatta ttgttgtaat attattattg 1993

tttgtaaaac atggttcaca taactagctt gtggaaacca gcaggtaaaa tgaattctta 2053

agttgacgct tttagttctg ttgtaaagca aagatgaata aaaatttcca atgtcgaaaa 2113

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2134

<210> 4

<211> 295

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Val Ile Cys Gln Leu Lys Gly Gly Ala Gln Met Leu Cys Ile Asp

1

5

10

15

Asn Cys Gly Ala Arg Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Leu Pro Gln Tyr
20 25 30

Asp Asp Gln Ser Ser Phe Pro Gln Ser Glu Leu Pro Lys Pro Met Thr
35 40 45

Thr Leu Val Gly Arg Leu Leu Pro Val Pro Ala Lys Leu Asn Leu Ile
50 55 60

Thr Gln Val Asp Asn Gly Ala Leu Pro Ser Ala Val Asn Gly Ala Ala
65 70 75 80

Phe Pro Ser Gly Pro Ala Leu Gln Gly Pro Pro Lys Ile Thr Leu Ser
85 90 95

Gly Tyr Cys Asp Cys Phe Ser Ser Gly Asp Phe Cys Asn Ser Cys Ser
100 105 110

Cys Asn Asn Leu Arg His Glu Leu Glu Arg Phe Lys Ala Ile Lys Ala
115 120 125

Cys Leu Asp Arg Asn Pro Glu Ala Phe Gln Pro Lys Met Gly Lys Gly
130 135 140

Arg Leu Gly Ala Ala Lys Leu Arg His Ser Lys Gly Cys Asn Cys Lys
145 150 155 160

Arg Ser Gly Cys Leu Lys Asn Tyr Cys Glu Cys Tyr Glu Ala Lys Ile
165 170 175

Met Cys Ser Ser Ile Cys Lys Cys Ile Ala Cys Lys Asn Tyr Glu Glu

180

185

190

Ser Pro Glu Arg Lys Met Leu Met Ser Thr Pro His Tyr Met Glu Pro

195

200

205

Gly Asp Phe Glu Ser Ser His Tyr Leu Ser Pro Ala Lys Phe Ser Gly

210

215

220

Pro Pro Lys Leu Arg Lys Asn Arg Gln Ala Phe Ser Cys Ile Ser Trp

225

230

235

240

Glu Val Val Glu Ala Thr Cys Ala Cys Leu Leu Ala Gln Gly Glu Glu

245

250

255

Ala Glu Gln Glu His Cys Ser Pro Ser Leu Ala Glu Gln Met Ile Leu

260

265

270

Glu Glu Phe Gly Arg Cys Leu Ser Gln Ile Leu His Ile Glu Phe Lys

275

280

285

Ser Lys Gly Leu Lys Ile Glu

290

295

<210> 5

<211> 299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Val Ile Cys Gln Leu Lys Gly Gly Thr Gln Met Leu Cys Ile Asp

1 5 10 15

Asn Ser Arg Thr Arg Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Val Pro Gln Tyr

20 25 30

Gln Asp Gln Asn Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Val Pro Lys Pro Met Thr

35 40 45

Ala Leu Val Gly Arg Phe Leu Pro Ala Ser Thr Lys Leu Asn Leu Ile

50 55 60

Thr Gln Gln Leu Glu Gly Ala Leu Pro Ser Val Val Asn Gly Ser Ala

65 70 75 80

Phe Pro Ser Gly Ser Thr Leu Pro Gly Pro Pro Lys Ile Thr Leu Ala

85 90 95

Gly Tyr Cys Asp Cys Phe Ala Ser Gly Asp Phe Cys Asn Asn Cys Asn

100 105 110

Cys Asn Asn Cys Cys Asn Asn Leu His His Asp Ile Glu Arg Phe Lys

115 120 125

Ala Ile Lys Ala Cys Leu Gly Arg Asn Pro Glu Ala Phe Gln Pro Lys

130 135 140

Ile Gly Lys Gly Gln Leu Gly Asn Val Lys Pro Gln His Asn Lys Gly
145 150 155 160

Cys Asn Cys Arg Arg Ser Gly Cys Leu Lys Asn Tyr Cys Glu Cys Tyr
165 170 175

Glu Ala Gln Ile Met Cys Ser Ser Ile Cys Lys Cys Ile Gly Cys Lys
180 185 190

Asn Tyr Glu Glu Ser Pro Glu Arg Lys Thr Leu Met Ser Met Pro Asn
195 200 205

Tyr Met Gln Thr Gly Gly Leu Glu Gly Ser His Tyr Leu Pro Pro Thr
210 215 220

Lys Phe Ser Gly Leu Pro Arg Phe Ser His Asp Arg Arg Pro Ser Ser
225 230 235 240

Cys Ile Ser Trp Glu Val Val Glu Ala Thr Cys Ala Cys Leu Leu Ala
245 250 255

Gln Gly Glu Glu Ala Glu Lys Glu His Cys Ser Lys Cys Leu Ala Glu
260 265 270

Gln Met Ile Leu Glu Glu Phe Gly Arg Cys Leu Ser Gln Ile Leu His
275 280 285

Thr Glu Phe Lys Ser Lys Gly Leu Lys Met Glu
290 295

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 6

ggagaatctg cgacaggcac

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 7

tccccagcca agttctcsgg

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 8

ttcattgacc tcaactacatg

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 9

gtggcagtga tggcatggac

20

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 10

tatgggcgcc tcctttcagc tgacaaat

28

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 11

actgaggaag cagatggagc gctttgag

28

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 12

tgactgaggg aaactgctct ggtcat

26

<210> 13

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 13

aacctgatgg ctggcttgat

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 14

tttttcttta ctttccttgg

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 15

ccgaagaagg gctccaagaa

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 16

tctccactca agacaagcct

20

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a human gene

<400> 17

tgggccagg gagtttactc a

21

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a human gene

<400> 18

tctcccagga ctatgggaac ccaa

24

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 19

tcgaattcta tggatgattg tcagctgaaa gga

33

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 20

gaattcgaat tcgcattccc ctttaccagc tt

32

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 21

accgtcgact gcctaaggtc ctgagaactt ggctgggga

39

【図面の簡単な説明】

【図 1】

マウスの様々な組織におけるTestin遺伝子の発現をノーザンブロット解析した結果を示す電気泳動写真である。

【図 2】

ヒトの様々な組織におけるTestin遺伝子の発現をノーザンブロット解析した結果を示す電気泳動写真である。

【図 3】

インビトロトランスレーションにより発現させたマウスTestinタンパク質の分子量を検出した結果を示す電気泳動写真である。

【図 4】

ICRストレインマウスの生後4日、8日、12日、18日、42日目の精巣、および56日目のW/Wvストレインマウスの精巣におけるTestin遺伝子の発現をノーザンブロット

ット解析した結果を示す電気泳動像である。精巣分化のマーカーとして「MEG1」および「ssH2B」を用いた。また、対照として「GAPDH」を用いた。

【図5】

精巣組織におけるTestin遺伝子の発現をインシチュウ・ハイブリダイゼーションで検出した結果を示す顕微鏡写真である。

【図6】

Testin遺伝子に特異的なプローブを用いてマウス染色体におけるTestin遺伝子の存在を検出した結果を示す顕微鏡写真および存在位置を示す模式図である。

【図7】

Testin遺伝子に特異的なプローブを用いてヒト染色体におけるTestin遺伝子の存在を検出した結果を示す顕微鏡写真および存在位置を示す模式図である。

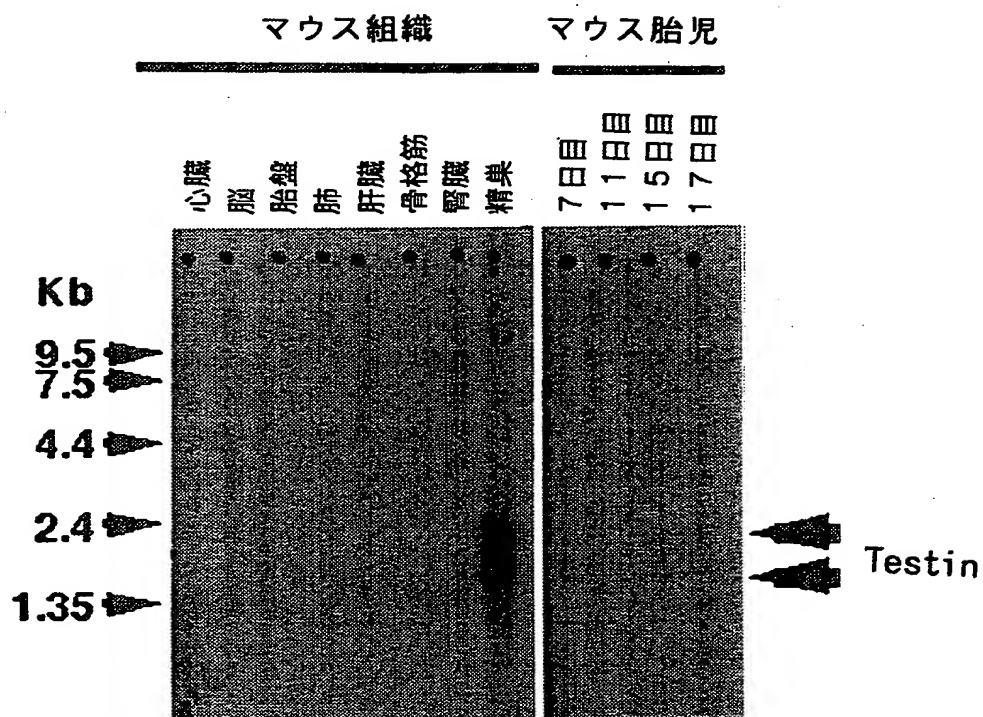
【図8】

完全なTestinタンパク質およびその欠失変異体の細胞内での局在性を検出した顕微鏡写真である。

【書類名】

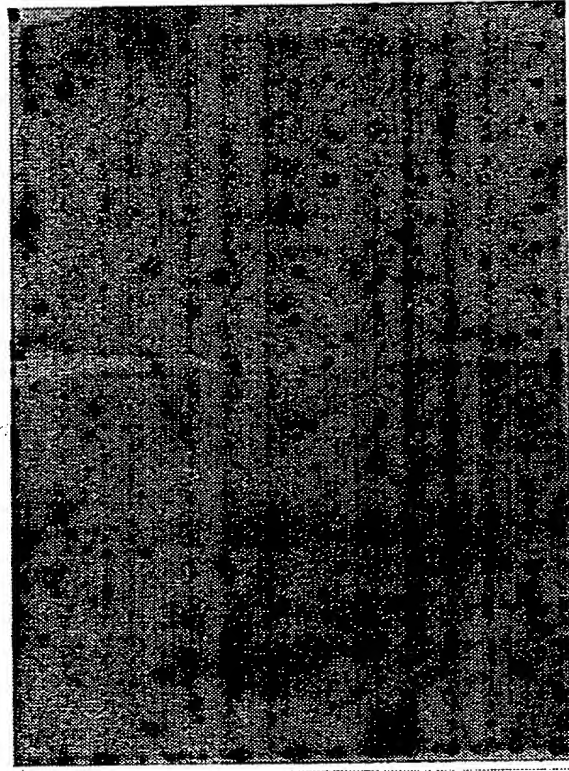
図面

【図 1】



図面代用写真

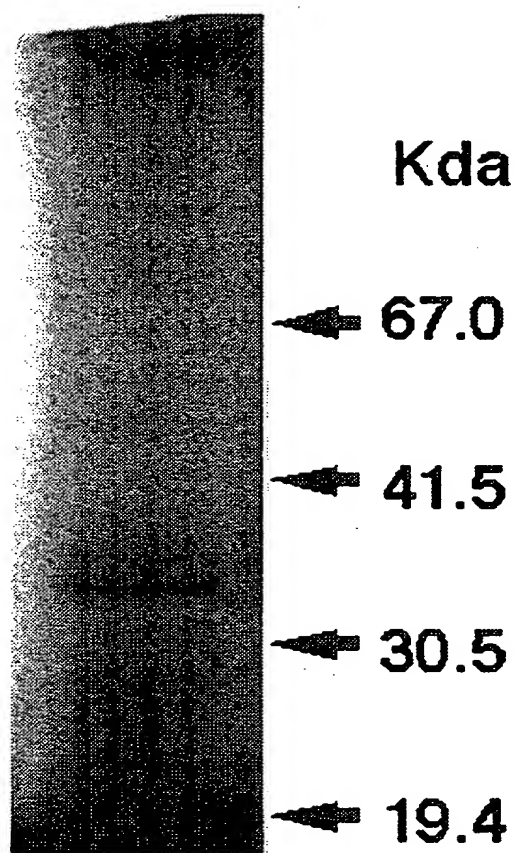
【図2】



心臓
脳
胎盤
肺
肝臓
骨格筋
腎臓
脾臓
胸腺
前立腺
精巣
卵巢
小腸
結腸
白血球

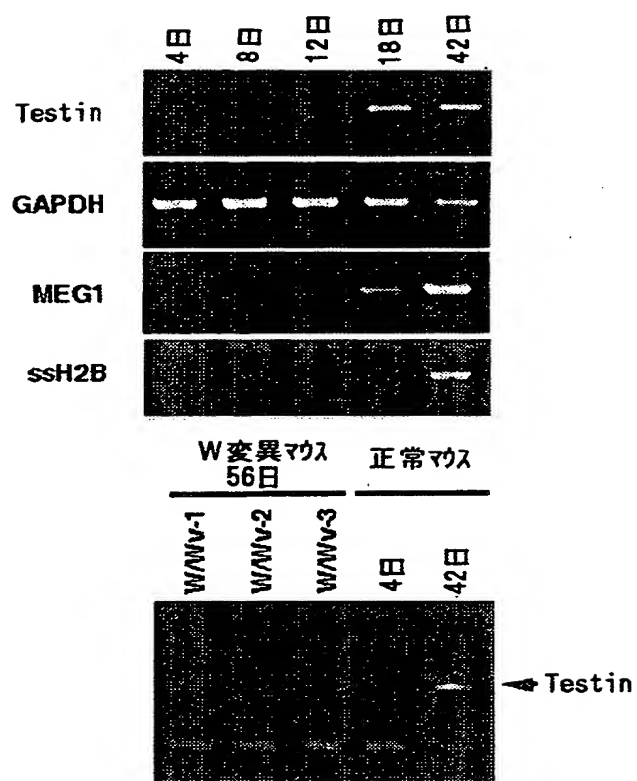
図面代用写真

【図3】



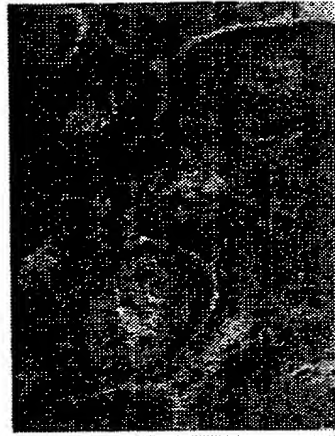
図面代用写真

【図 4】

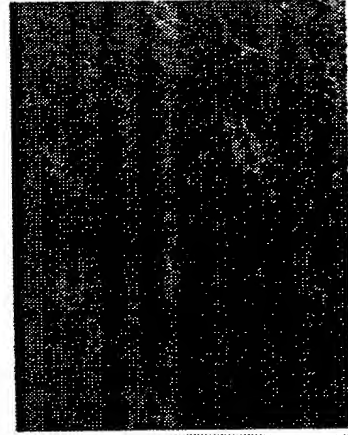


図面代用写真

【図5】



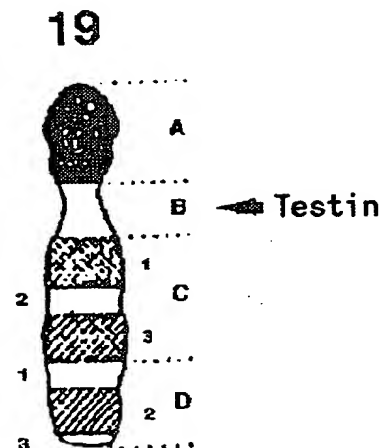
Testin-アンチセンスプライマー



Testin-センスプライマー

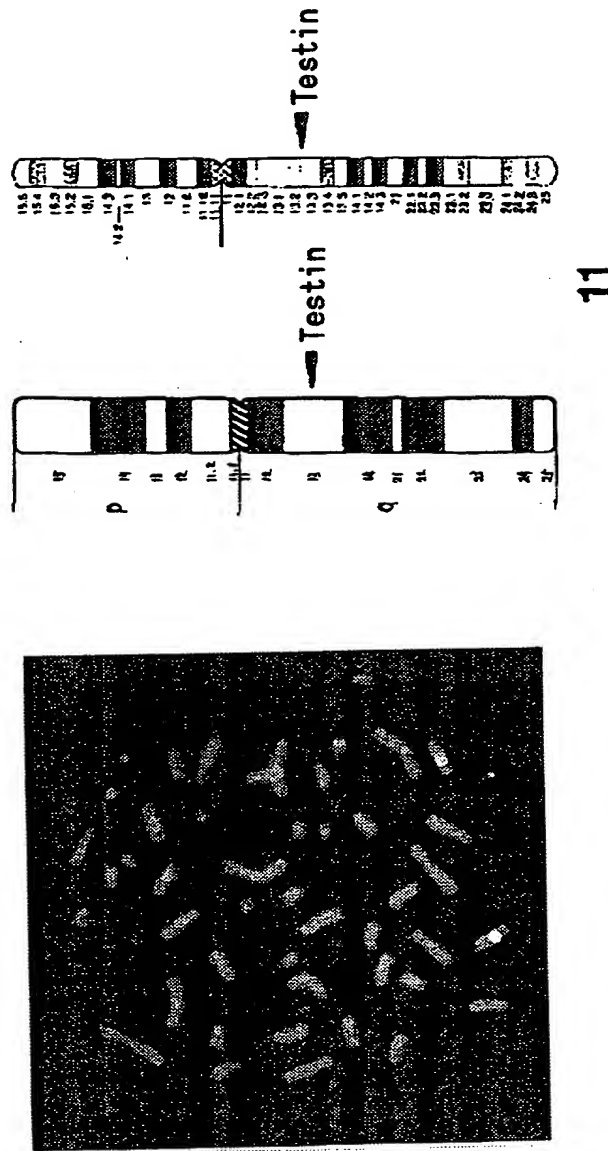
図面代用写真

【図6】



図面代用写真

【図7】



真写用代面圖

【図8】



pEGFC1-Testin欠失



pEGFC1-Testin完全

図面代用写真

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 精巢細胞の分化に関係する新規なタンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子を提供すること課題とする。

【解決手段】 細胞死を引き起こす未知のタンパク質をコードする遺伝子の発現を検討していたところ、偶然にも、初期の目的とは異なる精巢特異的に発現する遺伝子を単離するに至った。単離した遺伝子につき解析を行ったところ、該遺伝子はデータベース上に有意な相同性を示す遺伝子が存在しない新規な遺伝子配列であり、また精巢の分化制御に関与していることが示唆された。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 596102791
【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 153 番地 2
【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000001144
【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号
【氏名又は名称】 工業技術院長

【代理人】

【識別番号】 220000404
【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1-1-3
【氏名又は名称】 工業技術院生命工学工業技術研究所長

【代理人】

【識別番号】 100102978
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【代理人】

【識別番号】 100108774
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【代理人】

【識別番号】 100102978
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【代理人】

【識別番号】 100108774
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 C2-003

【提出日】 平成11年 4月23日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成10年特許願第219856号

【補正をする者】

【識別番号】 596102791

【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【補正をする者】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【指定代理人】

【識別番号】 220000404

【氏名又は名称】 工業技術院 生命工学工業技術研究所長 大箸 信一

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の指定代理人

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【代理関係の特記事項】 特許出願人 株式会社中外分子医学研究所の代理人

【復代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の復代理人

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 153 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 杉原 崇

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 153 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 レヌー ワダワ

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1-1-3 通産省工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 スニル シー カウル

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1-1-3 通産省工業技術院生命工学工業技術研究所内

【氏名】 三井 洋司

【その他】 本補正書で補正する理由は、平成 10 年 7 月 17 日付で提出しました特許願の発明者のうち、スニル シー カウルと三井 洋司の住所又は居所の欄を、「茨城県つくば市東 1-1-3 通産省工業技術院生命工学工業技術研究所内」とすべきところを、出願時に誤って「茨城県つくば市東 1-1 通産省工業技術院生命工学工業技術研究所内」と記載してしまった為であります。

認定・付加情報

特許出願の番号	平成10年 特許願 第219856号
受付番号	59900393635
書類名	手続補正書
担当官	東海 明美 7069
作成日	平成11年 6月16日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】

596102791

【住所又は居所】

茨城県新治郡新治村永井153番地2

【氏名又は名称】

株式会社中外分子医学研究所

【補正をする者】

【識別番号】

000001144

【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

【氏名又は名称】

工業技術院長

【指定代理人】

【識別番号】

220000404

【住所又は居所】

茨城県つくば市東1-1-3

【氏名又は名称】

工業技術院生命工学工業技術研究所長

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6

階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

【復代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6

階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

特平 10-219856

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2
氏 名 株式会社中外分子医学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日 1990年 9月20日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
氏 名 工業技術院長

